

jc997 U.S. PRO
10/084395
02/25/02

Our Ref.: 408.016A

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: :
ANDRE et al :
Serial No.: :
Filed: Concurrently Herewith :
For: PROCESS..FROM THESE MITES :

600 Third Avenue
New York, NY 10016
February 25, 2002

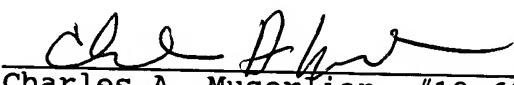
PRIORITY DOCUMENT(S)

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

With respect to the above-captioned application, Applicant(s)
claim the priority of the attached application(s) as provided by 35
U.S.C. 119.

Respectfully submitted,
BIERMAN, MUSERLIAN AND LUCAS


Charles A. Muserlian, #19,683
Attorney for Applicant(s)
Tel. # (212) 661-8000

CAM:sd

Enclosures: Certified Priority Document
French Patent Application 0102835 filed
January 3, 2001
Return Receipt Postcard



jc997 U.S. PRO
10/084395
02/25/02



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 04 FEV. 2002

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE**

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30
www.inpi.fr

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

D8 540 W /190600

REMISE DES PIÈCES		Réserve à l'INPI
DATE	1 MARS 2001	
LIEU	75 INPI PARIS	
N° D'ENREGISTREMENT	0102835	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		
DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI	01 MARS 2001	
Vos références pour ce dossier (facultatif) BFF 00/0650		

**1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

CABINET LAVOIX
2, Place d'Estienne d'Orves
75441 PARIS CEDEX 09

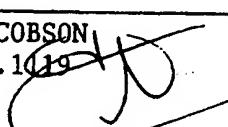
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie
2 NATURE DE LA DEMANDE		
Cochez l'une des 4 cases suivantes		
<input checked="" type="checkbox"/> Demande de brevet <input type="checkbox"/> Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/> Demande divisionnaire <input type="checkbox"/> Demande de brevet initiale <input type="checkbox"/> ou demande de certificat d'utilité initiale <input type="checkbox"/> Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		
<input type="checkbox"/> N° <input type="checkbox"/> N° <input type="checkbox"/> N°		Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/>

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

PROCEDE DE CULTURE D'ACARIENS, PRÉPARATION NUTRITIVE POUR CE PROCEDE, ET PRÉPARATION D'EXTRAITS ALLERGENIQUES A PARTIR DE CES ACARIENS.

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»
5 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»
Nom ou dénomination sociale STALLERGENES S.A.		
Prénoms		
Forme juridique		
N° SIREN		
Code APE-NAF		
Adresse	Rue	6, rue Alexis de Tocqueville, 92183 ANTHONY Cedex
Code postal et ville		
Pays FRANCE		
Nationalité Française		
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES		Réervé à l'INPI																											
DATE	1 MARS 2001																												
LIEU	75 INPI PARIS																												
N° D'ENREGISTREMENT																													
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	0102835																												
DB 540 W /190600																													
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		BFF 00/0650																											
6 MANDATAIRE <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%;">Nom</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Prénom</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Cabinet ou Société</td> <td colspan="2">CABINET LAVOIX</td> </tr> <tr> <td>N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Adresse</td> <td>Rue</td> <td>2 Place d'Estienne d'Orves</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Code postal et ville</td> <td>75441 PARIS CEDEX 09</td> </tr> <tr> <td>N° de téléphone <i>(facultatif)</i></td> <td colspan="2">01 53 20 14 20</td> </tr> <tr> <td>N° de télécopie <i>(facultatif)</i></td> <td colspan="2">01 48 74 54 56</td> </tr> <tr> <td>Adresse électronique <i>(facultatif)</i></td> <td colspan="2">brevets@cabinet-lavoix.com</td> </tr> </table>			Nom			Prénom			Cabinet ou Société	CABINET LAVOIX		N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			Adresse	Rue	2 Place d'Estienne d'Orves		Code postal et ville	75441 PARIS CEDEX 09	N° de téléphone <i>(facultatif)</i>	01 53 20 14 20		N° de télécopie <i>(facultatif)</i>	01 48 74 54 56		Adresse électronique <i>(facultatif)</i>	brevets@cabinet-lavoix.com	
Nom																													
Prénom																													
Cabinet ou Société	CABINET LAVOIX																												
N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel																													
Adresse	Rue	2 Place d'Estienne d'Orves																											
	Code postal et ville	75441 PARIS CEDEX 09																											
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>	01 53 20 14 20																												
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>	01 48 74 54 56																												
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>	brevets@cabinet-lavoix.com																												
7 INVENTEUR (S) <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 40%;">Les inventeurs sont les demandeurs .</td> <td><input type="checkbox"/> Oui</td> </tr> <tr> <td></td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée</td> </tr> </table>			Les inventeurs sont les demandeurs .	<input type="checkbox"/> Oui		<input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée																							
Les inventeurs sont les demandeurs .	<input type="checkbox"/> Oui																												
	<input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée																												
8 RAPPORT DE RECHERCHE <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 40%;">Établissement immédiat ou établissement différé</td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Paiement échelonné de la redevance</td> <td>Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques</td> </tr> <tr> <td></td> <td><input type="checkbox"/> Oui</td> </tr> <tr> <td></td> <td><input type="checkbox"/> Non</td> </tr> </table>			Établissement immédiat ou établissement différé	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	Paiement échelonné de la redevance	Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques		<input type="checkbox"/> Oui		<input type="checkbox"/> Non																	
Établissement immédiat ou établissement différé	<input checked="" type="checkbox"/>																												
	<input type="checkbox"/>																												
Paiement échelonné de la redevance	Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques																												
	<input type="checkbox"/> Oui																												
	<input type="checkbox"/> Non																												
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 40%;"></td> <td>Uniquement pour les personnes physiques</td> </tr> <tr> <td></td> <td><input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (<i>joindre un avis de non-imposition</i>)</td> </tr> <tr> <td></td> <td><input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt (<i>joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence</i>):</td> </tr> </table>				Uniquement pour les personnes physiques		<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (<i>joindre un avis de non-imposition</i>)		<input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt (<i>joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence</i>):																					
	Uniquement pour les personnes physiques																												
	<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (<i>joindre un avis de non-imposition</i>)																												
	<input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt (<i>joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence</i>):																												
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes																													
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE <i>(Nom et qualité du signataire)</i>		C. JACOBSON n° 92.1019 																											
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI  C. TRAN																											

5 La présente invention a trait à un procédé de culture d'acariens en vue de la production d'extraits allergéniques d'acariens, ainsi qu'à des formulations nutritives destinées à être mises en œuvre dans ces procédés.

10 Différentes espèces d'acariens sont utilisées pour préparer des extraits allergéniques mis en œuvre dans des formulations d'allergologie pour servir, par exemple, de tests d'allergologie *in vivo* ou *in vitro*, ou encore de préparations désensibilisantes administrées aux patients.

15 Parmi ces acariens on trouve notamment les espèces suivantes : *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia kulagini* ou *tropicalis*, *Pyroglyphus africanus*, et *Euroglyphus maynei*, qui sont des acariens domestiques qui se nourrissent principalement de squames humaines.

20 On utilise classiquement, pour produire ces acariens, des milieux de culture contenant des squames humaines convenablement traitées et autoclavées en vue de l'inactivation des virus, bactéries et des agents transmissibles non conventionnels tels que les prions.

25 Les acariens ainsi produits permettent d'obtenir, par extraction, des extraits allergéniques d'une grande qualité et pratiquement dépourvus d'allergènes d'autre origine susceptibles d'entraîner des réactions croisées pouvant mettre des tests en défaut ou susceptibles 30 d'induire des allergies.

 D'autres procédés de culture d'acariens sont connus, mettant en œuvre des milieux nutritifs à base de protéines telles que des œufs de crevettes ou de la poudre de foie de porc. Ces milieux permettent d'obtenir

des productions satisfaisantes, mais comportent des substances non acariennes, notamment d'origine animale, pouvant être allergisantes et/ou à potentiel infectieux.

5 Bien que les procédés d'inactivation utilisés pour traiter les squames humaines destinées à la culture d'acariens soient d'une efficacité extrêmement élevée et que des contaminations d'agents infectieux conventionnels ou non soient hautement improbables, il est néanmoins souhaitable d'utiliser, pour cultiver les acariens, des milieux nutritifs d'origine non humaine et non animale et dépourvus d'éléments susceptibles d'être allergéniques.
10

15 La présente invention se propose donc de fournir un procédé de culture et de production d'acariens, et notamment des acariens des espèces précitées, limitant au maximum le risque de présence d'agents infectieux d'origine animale ou humaine.

Un autre objectif de l'invention est de fournir un tel procédé qui permette un rendement important en acariens.

20 Un autre objectif encore de l'invention est d'améliorer éventuellement l'antigénicité des acariens destinés à être utilisés ou extraits pour former les formulations finales.

25 Un autre objectif encore de l'invention est de permettre d'éliminer facilement une grande partie du milieu de culture.

30 L'invention a pour objet un procédé de culture et de production d'acariens, et notamment d'acariens appartenant à l'une au moins des espèces suivantes : *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia kulagini* ou *tropicalis*, *Pyroglyphus africanus*, et *Euroglyphus maynei*, caractérisée en ce que l'on cultive les acariens sur milieu dépourvu d'éléments ou de protéines humaines ou animales et comprenant, en

quantités efficaces, une pluralité d'acides aminés sous forme particulière avec une granulométrie inférieure à 250 µm, ou sous forme lyophilisée.

La granulométrie recherchée d'acides aminés peut 5 être obtenue par un broyage des acides aminés, individuellement ou en mélange.

De façon équivalente les acides aminés peuvent être obtenus par dissolution des acides aminés, puis lyophilisation. Dans ce cas.. on préfère que la 10 lyophilisation aboutisse à des particules de taille inférieure à 250 µm.

Bien entendu, dans le milieu selon l'invention, certains seulement des acides peuvent avoir été broyés et/ou lyophilisés, notamment en fonction de leurs 15 caractéristiques physiques, par exemple leur solubilité, et, le cas échéant, certains acides peuvent être ajoutés tels quels dans le mélange.

L'invention repose sur la découverte que, si l'on utilise tels quels (sans broyage et/ou sans 20 solubilisation-lyophilisation et/ou sans adjonction de sels) les acides aminés disponibles commercialement, les acariens se cultivent extrêmement mal et les rendements sont très faibles. De façon surprenante, les mélanges 25 d'acides aminés ayant les caractéristiques définies dans l'invention aboutissent à des rendements comparables voire supérieurs aux rendements classiques utilisant des squames humaines.

Les mélanges d'acides aminés comportent, de 30 préférence, la majorité ou la totalité des acides aminés constitutifs naturels des protéines. Par majorité on entend au moins 50%, par exemple 60 à 80%, des vingt acides aminés constitutifs naturels des protéines ou d'acides aminés équivalents assimilables. On peut cependant, également, ajouter des acides aminés non

constitutifs, ou remplacer certains des acides aminés par des acides aminés non constitutifs de protéines.

5 Dans un mode de réalisation particulier, on peut avantageusement mettre en œuvre un mélange d'acides aminés se rapprochant de la composition de la kératine ou de la couche cornée.

10 Cependant, dans des variantes de l'invention, on peut également utiliser des mélanges d'acides aminés se rapprochant de la composition des œufs de crevettes ou du soja. Dans d'autres formulations on peut s'éloigner de cette distribution.

15 Les proportions respectives des acides aminés peuvent se rapprocher des proportions quantitatives des acides aminés dans des substances telles que la kératine, ou la couche cornée, les œufs de crevettes ou le soja, mais une identité de distribution en proportion n'est nullement exigée, dès lors que les acides aminés individuels sont présents en quantité suffisante.

20 Le milieu nutritif qui comporte le mélange d'acides aminés du procédé selon l'invention peut également comporter d'autres éléments usuels de milieux nutritifs pour acariens, destinés soit à apporter un complément nutritif, soit à donner au milieu une texture propre au développement et à la multiplication des acariens, ainsi 25 que des sels.

Ainsi on préfère incorporer, dans le milieu de culture, des germes de blé et/ou de la levure, notamment de la levure de boulangerie, et/ou de la cyanocobalamine et/ou de la d-biotine. Le milieu peut encore comporter 30 d'autres vitamines.

Les germes de blé sont de préférence chauffés pour supprimer tout risque d'allergénicité.

Dans le procédé selon l'invention, le milieu de culture, contenant le mélange d'acides aminés, est amené

à un degré d'humidité convenable, usuel pour les acariens que l'on cultive, et maintenu à la température habituelle convenable. Les durées de culture peuvent être, par exemple, de trois mois et l'on préfèrera des durées 5 classiques de 2 à 5 mois.

L'invention a également pour objet les milieux de culture contenant les mélanges d'acides aminés selon l'invention.

L'invention a encore pour objet les procédés de 10 préparations d'extraits ou de formulations d'allergènes obtenus à partir des acariens cultivés par le procédé selon l'invention.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture de la description 15 suivante, faite à titre d'exemple non limitatif.

Des cultures ont été conduites simultanément sur milieux acides aminés selon les exemples 1 et 3 et sur squames humaines selon l'exemple 2.

Exemple 1 :

Cet exemple décrit un procédé de culture dans un milieu contenant une préparation commerciale d'acides aminés.

On prépare un milieu de culture contenant des germes de blé, de la cyanocobalamine, de la levure de boulangerie et de la D-biotine.

Les germes de blé sont autoclavés à 121°C pendant 20' puis broyés et tamisés sur un tamis de 250 µm.

La cyanocobalamine est broyée et tamisée sur un tamis de 250 µm de porosité.

La levure de boulangerie est chauffée à 122°C pendant 2 à 3', puis entre 100 et 135°C pendant 12" dans un tambour dont la vitesse de rotation est de 5 tours par minute, puis chauffée à 100°C pendant 15'.

La préparation commerciale d'acides aminés a été

obtenue auprès de la société Frésénius-Kabi France S.A.
Sa composition est la suivante, qsp 1 L d'eau PPI :

	- L-alanine	3,8 g
5	- L-arginine	4,2 g
	- acide L-aspartique	5,2 g
	- L-cystéine chlorhydrate monohydratée exprimé en L-cystéine/L-cystine	1,7 g
10	- acide L-glutamique	11,5 g
	- glycine	2,7 g
	- L-histidine	3,1 g
	- L-isoleucine	5,0 g
	- L-leucine	6,7 g
	- Chlorhydrate de L-Lysine, exprimé en L-lysine	5,0 g
15	- L-méthionine	2,4 g
	- L-phénylalanine	7,0 g
	- L-proline	10,3 g
	- L-sérine	9,6 g
	- L-thréonine	3,8 g
	- L-tryptophane	1,3 g
20	- L-tyrosine	0,6 g
	- L-valine	5,5 g
	- Chlorure de calcium dihydraté	0,44 g
	- Sulfate de magnésium heptahydraté	0,493 g
	- Hydroxyde de sodium	2,6 g
25	- Hydroxyde de potassium	0,70 g
	- Chlorure de potassium	0,078 g

La solution est lyophilisée et le lyophilisat récolté est tamisé sur un tamis vibrant de 250 µm de porosité.

30 Le milieu proprement dit est préparé de la façon suivante :

Pour 600 g de milieu :

On pèse 252 g de germes de blé tamisé, 252 g de levures tamisées, 90 g de la solution d'acides aminés

lyophilisée et tamisée, 5,4 g de cyanocobalamine tamisée et 0,6 g de D-biotine, l'ensemble étant homogénéisé dans un homogénéisateur puis tamisé sur un tamis de 400 µm de porosité. Le milieu est conditionné en flacons bouchés identifiés et peut être conservé en chambre froide à température comprise entre +2°C et +8°C.

La culture proprement dite est effectuée de la façon suivante :

Les milieux préparés sont ensemencés avec un échantillon de cultures d'ensemencement classique de *Dermatophagoides pteronisinus*. La culture s'effectue en flacons à une température de 25°C, à un degré humidité de 75%. Les prélèvements sont effectués à des époques différentes. Les milieux récoltés sont ensuite lyophilisés et extraits à 5% en solution de bicarbonate d'ammonium 4 g/l pendant 24 heures à +4°C, puis centrifugés à 3000 tour par min. pendant 15 min. à +4°C. Le surnageant est récolté puis filtré sur filtre Millex HV de 0,45 µm de porosité (Millipore).

Dans les extraits obtenus on dose l'activité allergénique totale (par Rast-inhibition), les protéines (par la technique de Lowry et/ou la technique de Bradford), et les allergènes majeurs Der p 1 et Der p 2 (à l'aide des kits de dosage usuels).

Le résultat du Rast-inhibition est exprimé en IR/ml (IR : indice de réactivité), les extraits étant dosés en comparaison avec un extrait de référence dont l'activité est de 100 IR/ml.

Exemple 2 :

Le milieu de l'exemple 2 est identique à celui de l'exemple 1 à la différence que la solution commerciale lyophilisée d'acides aminés est remplacée par une préparation de squames humaines.

Ces squames sont autoclavées dans des sachets à

134°C pendant 18'. Les squames sont ensuite déposées dans des plateaux en inox mis dans une étuve à 37°C pendant 1 à 2 semaines. Les squames sont ensuite broyées et tamisées avec des tamis de 500 et 250 µm.

5 La poudre de squames recueillie est ensuite traitée à l'acétone et laissée à décanter 24 heures. Le surnageant est éliminé. On procède ensuite à une dernière opération de lavage en acétone. On recueille le culot que l'on réparti en couches minces sur des plateaux et que 10 l'on recouvre d'une feuille d'aluminium perforée. Cette substance est séchée sous hotte puis finalement tamisée avec un tamis vibrant de 250 µm.

15 Au lieu des 90 g de mélange d'acides aminés, le milieu de culture de cet exemple comprend 90 g de la préparation de squames humaines précitée.

Exemple 3 :

Le milieu de culture comprend les germes de blé, la cyanocobalamine et la levure conformément aux exemples 1 et 2.

20 On prépare un mélange d'acides aminés de la façon suivante :

Dans un récipient on verse 10 litres d'eau distillée stérile et on solubilise les acides aminés suivants :

25	- L-alanine	17,2 g
	- L-arginine	26,4 g
	- L-cystéine chlorhydrate monohydratée	4,4 g
	- glycine	49,6 g
	- L-histidine	5,2 g
30	- L-isoleucine	13,2 g
	- chlorhydrate de L-Lysine	20,0 g
	- L-méthionine	8,0 g
	- L-proline	8,8 g
	- L-sérine	44,0 g

	- L-thréonine	13,6 g
	- L-valine	13,6 g
	- L-tryptophane	.1,3 g
	- L-phénylalanine	20,8 g
5	- L-leucine	34,8 g
	- acide L-glutamique	64,4 g
	- acide L-aspartique	9,7 g

La solution est ensuite lyophilisée et le lyophilisat récolté est tamisé sur un tamis vibrant de 10 250 µm.

On broie séparément 6,5 g d'acide aspartique et 4,0 g de tyrosine.

Pour préparer le milieu on ajoute aux 252 g de germes de blé, 252 g de levures, 5,4 g de cyanocobalamine 15 et 0,6 g de D-biotine, 79,5 g du mélange lyophilisé précité, 6,5 g d'acide aspartique broyé et 4,0 g de tyrosine broyée.

L'ensemble est homogénéisé puis tamisé sur 400 µm. Après ensemencement la culture est effectuée comme dans 20 l'exemple 1 et 2.

Les résultats comparatifs des exemples 1 à 3 figurent dans le tableau 1 pour un premier cycle de culture, après 3 mois, et dans les tableaux 2 et 3 pour un second cycle de culture (les acariens cultivés sur un 25 milieu donné sont ré-ensemencés sur le même milieu), après 2,5 mois et 3 mois, respectivement :

TABLEAU 1

Activité allergénique totale, taux protéiques, de Der p 1 et de Der p 2 dans les extraits au 1/20^{ème} de *Dermatophagoïdes pteronyssinus* cultivé sur différents milieux après trois mois de culture.

Milieu contenant	Acides aminés (exemple 1)	Squames humaines (exemple 2)	Acides aminés (exemple 3)
Activité allergénique totale (IR/ml)	263	284	573
Taux protéique (µg/ml ; technique de Bradford)	537	544	217
Taux protéique (µg/ml ; technique de Lowry)	5689	6446	5538
Der p 1 (µg/ml)	187,5	231,5	69,0
Der p 2 (µg/ml)	2,0	2,5	10,0

Tableau 2

10. Activité allergénique totale, taux protéique, de Der p 1 et de Der p 2 dans les extraits au 1/20^{ème} de *Dermatophagoïdes pteronyssinus* cultivé pour un second cycle sur différents milieux après deux mois et demi de culture.

Milieu contenant	Acides aminés (exemple 1)	Squames humaines (exemple 2)	Acides aminés (exemple 3)
Activité allergénique totale (IR/ml)	617	713	195
Taux protéique (µg/ml ; technique de Bradford)	328	371	75
Der p 1 (µg/ml)	83,0	138,0	8,5

Der p 2 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	19,5	19,5	3,0
-------------------------------------	------	------	-----

Tableau 3

Activité allergénique totale, taux protéique, de Der p 1 et de Der p 2 dans les extraits au 1/20ème de Dermatophagoïdes pteronyssinus cultivé pour un second cycle sur différents milieux après trois mois de culture.

Milieu contenant	Acides aminés (exemple 1)	Squames humaines (exemple 2)	Acides aminés (exemple 3)
Activité allergénique totale (IR/ml)	631	486	192
Taux protéique ($\mu\text{g}/\text{ml}$; technique de Bradford)	363	411	110
Der p 1 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	206,0	267,5	23,0
Der p 2 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	14,0	4,5	5,0

On voit que si la culture sur acides aminés suivant l'exemple 3 donne de bons résultats lors d'un premier cycle de culture, elle donne de mauvais résultats sur un second cycle de culture. Cet exemple n'est donc pas adapté à la culture en routine des acariens.

En revanche, la culture sur acides aminés suivant l'exemple 1 semble bien adaptée, puisque non seulement les résultats sont satisfaisants après deux cycles de culture, mais encore ils sont très proches des résultats obtenus avec les squames humaines, qui constituent l'alimentation naturelle des acariens dont il est ici question. La relative faiblesse des résultats obtenus lors du premier essai est certainement imputable à un temps de culture trop important (une récolte à deux mois et demi aurait donné certainement de meilleurs résultats).

REVENDICATIONS

1. Milieu de culture et de production d'acariens, et notamment d'acariens appartenant à l'une au moins des espèces suivantes : *Dermatophagoïdes pteronyssinus*, *Dermatophagoïdes farinae*, *Blomia kulagini* ou *tropicalis*, *Pyroglyphus africanus*, et *Euroglyphus maynei*, caractérisé en ce qu'il est dépourvu d'éléments ou de protéines humaines ou animales et qu'il comprend, en quantités efficaces, une pluralité d'acides aminés sous forme particulaire avec une granulométrie inférieure à 250 µm ou sous forme lyophilisée.

2. Milieu selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend des acides aminés obtenus par un broyage d'acides aminés.

3. Milieu selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il comprend également des acides aminés lyophilisés et/ou tels quels du commerce.

4. Milieu selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend des acides aminés lyophilisés et des acides aminés tels quels du commerce.

5. Milieu selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'il contient des sels.

6. Milieu selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le mélange d'acides aminés comporte au moins 50% des acides aminés constitutifs naturels des protéines ou leurs équivalents.

7. Milieu selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que le mélange d'acides aminés reproduit le spectre des acides aminés constitutifs de la kératine ou de la couche cornée.

8. Milieu selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le mélange d'acides aminés reproduit le spectre des acides aminés présents dans les

œufs de crevettes ou dans le soja.

9. Milieu selon l'une des revendications 7 et 8 caractérisé en ce que les proportions respectives des acides aminés sont proches des proportions quantitatives des acides aminés et des sels dans des substances telles que la kératine ou la couche cornée ou les œufs de crevettes ou le soja.

10. Milieu selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comporte également d'autres éléments usuels de milieux nutritifs pour acariens, destinés à apporter un complément nutritif, et/ou à donner au milieu une texture propre au développement et à la multiplication des acariens.

11. Milieu selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comporte en outre, des germes de blé et/ou de la levure, notamment de la levure de boulangerie, et/ou de la cyanocobalamine et/ou de la d-biotine.

12. Milieu selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il peut contenir du soja.

20 13. Milieu selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'il comporte au moins 50% des acides aminés suivants:

- L-alanine
- L-arginine
- Acide L-aspartique
- L-cystéine/cystine
- Acide L-glutamique
- glycine
- L-histidine
- L-isoleucine
- L-leucine
- L-Lysine
- L-méthionine
- L-phénylalanine

- L-proline
- L-sérine
- L-thréonine
- L-tryptophane
- 5 - L-tyrosine
- L-valine

14. Milieu selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il comprend les acides aminés dans les proportions suivantes, pour un total de 93,711 g :

10	- L-alanine	3,8 g
	- L-arginine	4,2 g
	- acide L-aspartique	5,2 g
	- L-cystéine chlorhydrate monohydratée exprimé en L-cystéine/L-cystine	1,7 g
15	- acide L-glutamique	11,5 g
	- glycine	2,7 g
	- L-histidine	3,1 g
	- L-isoleucine	5,0 g
	- L-leucine	6,7 g
20	- Chlorhydrate de L-lysine, exprimé en L-lysine	5,0 g
	- L-méthionine	2,4 g
	- L-phénylalanine	7,0 g
	- L-proline	10,3 g
	- L-sérine	9,6 g
25	- L-thréonine	3,8 g
	- L-tryptophane	1,3 g
	- L-tyrosine	0,6 g
	- L-valine	5,5 g
	- Chlorure de calcium dihydraté	0,44 g
30	- Sulfate de magnésium heptahydraté	0,493 g
	- Hydroxyde de sodium	2,6 g
	- Hydroxide de potassium	0,70 g
	- Chlorure de potassium	0,078 g

15. Procédé de culture et de production d'acariens,

et notamment d'acariens appartenant à l'une au moins des espèces suivantes : *Dermatophagoïdes pteronyssinus*, *Dermatophagoïdes farinae*, *Blomia kulagini* ou *tropicalis*, *Pyroglyphus africanus*, et *Euroglyphus maynei*, caractérisé en ce que l'on cultive les acariens sur un milieu selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

16. Procédé selon la revendication 15 caractérisé en ce que le milieu de culture, contenant le mélange d'acides aminés, est amené à un degré d'humidité convenable, usuel pour les acariens que l'on cultive, et maintenu à la température habituelle convenable.

17. Procédé selon l'une des revendications 15 et 16 caractérisé en ce que l'on effectue la culture entre 2 et 5 mois.

18. Procédé d'obtention d'une préparation d'allergènes caractérisé en ce que l'on réalise une extraction des allergènes de la culture selon l'une des revendications 15 à 17.

20.

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° . 1/1.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W /260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)	BFF 00/0650	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0102835	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
PROCEDE DE CULTURE D'ACARIENS, PREPARATION NUTRITIVE POUR CE PROCEDE, ET PREPARATION D'EXTRAITS ALLERGENIQUES A PARTIR DE CES ACARIENS.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
STALLERGENES S.A.		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).		
Nom Claude ANDRE		
Prénoms		
Adresse	Rue	2, le Mirabeau 69450 SAINT CYR AU MONT d'OR FRANCE
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom Thierry BATARD		
Prénoms		
Adresse	Rue	49, rue Joseph Chaleil 78000 VERSAILLES FRANCE
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Paris, le 1 mars 2001		
C. JACOBSON n° 92.1119		